

(19)

OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 282 410**

(51) Int. Cl.:

C07D 217/18 (2006.01)**C07D 217/20** (2006.01)**C07D 417/12** (2006.01)**C07D 417/14** (2006.01)**C07D 409/12** (2006.01)**C07D 407/08** (2006.01)**C07D 403/12** (2006.01)**A61K 31/47** (2006.01)**A61P 35/00** (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Número de solicitud europea: **02724438 .3**(86) Fecha de presentación : **30.04.2002**(87) Número de publicación de la solicitud: **1397350**(87) Fecha de publicación de la solicitud: **17.03.2004**(54) Título: **Derivados de isoquinolinona como inhibidores de PARP.**(30) Prioridad: **08.05.2001 US 289631 P**
03.01.2002 US 345274 P(73) Titular/es: **Kudos Pharmaceuticals Limited**
327-329 Cambridge Science Park, Milton Road
Cambridge, Cambridgeshire CB4 0WG, GB
Maybridge Limited(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.10.2007(72) Inventor/es: **Martin, Niall M. B.;**
Smith, Graeme C. M.;
White, Charles Richard;
Newton, Roger Frank;
Douglas, Diane Gillian;
Eversley, Penny Jane y
Whittle, Alan John(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.10.2007(74) Agente: **Zea Checa, Bernabé**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Derivados de isoquinolinona como inhibidores de PARP.

5 La presente invención se refiere a derivados de isoquinolinona, y a su uso como medicamentos. En particular, la presente invención se refiere al uso de estos compuestos para inhibir la actividad del enzima poli(ADP-ribosa)polimerasa, también conocido como poli(ADP-ribosa)sintetasa y poliADP-ribosiltransferasa, y denominados comúnmente como PARP.

10 El enzima PARP de mamífero (una proteína multidominio de 113 kDa) está implicado en la señalización de daños en el ADN gracias a su capacidad para reconocer y enlazarse rápidamente con roturas en cadenas simples o dobles de ADN (D'Amours *et al*, 1999, Biochem. J. 342: 249-268).

15 Varias observaciones han llevado a la conclusión de que la PARP participa en varias funciones relacionadas con el ADN incluyendo la amplificación de genes, la división celular, la diferenciación, la apoptosis, la reparación de escisiones del ADN BASE y también afecta a la longitud telomérica y a la estabilidad cromosómica (d'Adda di Fagagna *et al*, 1999, Nature Gen., 23(1): 76-80).

20 Los estudios sobre el mecanismo según el cual la PARP modula la reparación del ADN y otros procesos han demostrado la importancia de su papel en la formación de cadenas poli(ADP-ribosa) dentro del núcleo celular (Althaus, F.R. y Richter, C., 1987, ADP-Ribosylation of Proteins: Enzymology and Biological Significance, Springer-Verlag, Berlin). La PARP activada y enlazada a ADN utiliza NAD para sintetizar poli(ADP-ribosa) en varias proteínas nucleares diana, incluyendo la topoisomerasa, las histonas y la misma PARP (Rhun *et al*, 1998, Biochem. Biophys. Res. Commun., 245:1-10). La poli(ADP-ribosil)ación también se ha asociado con la transformación maligna. Por ejemplo, 25 la actividad de la PARP es mayor en los núcleos aislados de los fibroblastos transformados SV40, mientras que las células leucémicas y las células de cáncer de colon muestran mayor actividad enzimática que los leucocitos y la mucosa del colon equivalentes normales (Miwa *et al*, 1977, Arch. Biochem. Biophys. 181: 313-321; Burzio *et al*, 1975, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 149: 933-938; y Hirai *et al*, 1983, Cancer Res. 43: 3441-3446).

30 Se han utilizado varios inhibidores de la PARP de bajo peso molecular para elucidar el papel funcional de la poli(ADP-ribosil)ación en la reparación del ADN. La inhibición de la PARP en células tratadas con agentes alquilantes conduce a un marcado incremento de la rotura de cadenas de ADN y de la muerte celular (Durkacz *et al*, 1980, Nature 283: 593-596; Berger, N.A., 1985, Radiation Research, 101: 4-14).

35 Posteriormente, dichos inhibidores han demostrado aumentar los efectos de la respuesta a la radiación mediante la supresión de la reparación de daños potencialmente letales (Ben-Hur *et al*, 1984, British Journal of Cancer, 49 (Suppl. VI): 34-42; Schlicker *et al*, 1999, Int. J. Radiat. Bio., 75: 91-100). Se ha descrito que los inhibidores de la PARP son efectivos en células tumorales hipóxicas sensibles a la radiación (US 5.032.617; US 5.215.738 y US 5.041.653).

40 Además, los animales con la PARP inactivada ("PARP knockout") (PARP -/-) muestran una inestabilidad genómica en respuesta a agentes alquilantes y a irradiación γ (Wang *et al*, 1995, Genes Dev., 9: 509-520; Menissier de Murcia *et al*, 1997, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94: 7303-7307).

45 También se ha descrito el papel de la PARP en ciertas enfermedades vasculares, shock séptico, daños isquémicos y neurotoxicidad (Cantoni *et al*, 1989, Biochim. Biophys. Acta, 1014: 1-7; Szabo, *et al*, 1997, J. Clin. Invest., 100: 723-735). Como muestran los estudios de inhibición de la PARP, uno de los principales factores que contribuyen a tales estados patológicos es el daño que provocan los radicales oxígeno en el ADN que conduce a la rotura de cadenas de ADN, las cuales son reconocidas por la PARP (Così *et al*, 1994, J. Neurosci. Res., 39: 38-46; Said *et al*, 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 93: 4688-4692). Más recientemente, se ha descrito que la PARP actúa en la patogénesis del shock hemorrágico (Liaudet *et al*, 2000, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 97(3): 10203-10208).

50 También se ha demostrado que la efectividad de la infección retroviral de células de mamífero está bloqueada por la inhibición de la actividad de la PARP. Se demostró que tal inhibición de la infección con vectores retrovirales recombinantes se da en diferentes tipos celulares (Gaken *et al*, 1996, J. Virology, 70(6): 3992-4000). Así, los inhibidores de la PARP se han desarrollado para el uso en terapias antivirales y en el tratamiento del cáncer (WO91/18591).

55 Además, se ha especulado que la inhibición de la PARP retrasa la aparición de síntomas de envejecimiento en fibroblastos humanos (Rattan y Clark, 1994, Biochem. Biophys. Res. Comm., 201 (2): 665-672). Esto puede estar relacionado con el papel que tiene la PARP en el control de la función telomérica (d'Adda di Fagagna *et al*, 1999, Nature Gen., 23 (1): 76-80).

60 El documento EP 0 355 750 describe clases de isoquinolinonas 5-sustituidas y dihidroisoquinolinonas como inhibidores de la PARP. Incluye como ejemplos sustituyentes en la posición 3 y/o 4 del anillo que contiene nitrógeno, incluyendo metilo, fenilo, bromo o amino.

65 El documento WO 99/11624 describe varios inhibidores de la PARP entre los cuales se encuentran varios derivados de isoquinolinonas.

ES 2 282 410 T3

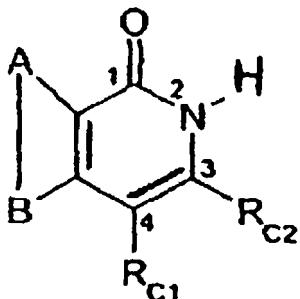
Los inventores de la presente invención han descubierto que otros derivados de la isoquinolinona y la dihidroisoquinolinona y compuestos relacionados actúan como inhibidores de la PARP.

Por lo tanto, en un primer aspecto de la presente invención se proporcionan compuestos de la fórmula:

5

10

15



20

y sus sales de tautómeros y solvatos donde:

A y B juntos representan un anillo bencénico fusionado opcionalmente sustituido; uno de R_{C1} y R_{C2} es -CH₂-R_L, y el otro de R_{C1} y R_{C2} es H,

25

R_L es fluorofenilo.

30

Un segundo aspecto de la invención proporciona el uso de compuestos del primer aspecto de la invención en la preparación de un medicamento para la inhibición de la actividad de la PARP.

35

Un tercer aspecto de la presente invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden un compuesto del primer aspecto y un portador o un diluyente farmacéuticamente aceptable.

35

Otro aspecto de la invención proporciona el uso de los compuestos tal como se definen en el primer aspecto de la invención para la preparación de un medicamento para el tratamiento de:

40

enfermedades vasculares; shock séptico; daños isquémicos;

neurotoxicidad; shock hemorrágico; infecciones virales; o

45

enfermedades que mejoran con la inhibición de la PARP.

45

Otro aspecto de la invención proporciona el uso de los compuestos tal como se definen en el primer aspecto de la invención en la preparación de un medicamento para el uso como adyuvante en la terapia del cáncer o para sensibilizar células tumorales al tratamiento con radiación ionizante o agentes quimioterapéuticos.

Definiciones

50

El término "anillo aromático" se utiliza en la presente invención en su sentido convencional para referirse a una estructura cíclica aromática, es decir, una estructura cíclica que tiene orbitales n-electrónicos deslocalizados.

55

El anillo aromático fusionado con la estructura principal, es decir, el formado por -A-B-, puede incluir anillos aromáticos fusionados adicionales (resultando en, por ejemplo, grupos naftilo o antracenilo). Los anillo(s) aromáticos pueden comprender únicamente átomos de carbono, o pueden comprender átomos de carbono y uno o más heteroátomos, incluyendo, pero sin limitarse a, átomos nitrógeno, oxígeno, y de azufre. Preferiblemente, los anillo(s) aromático(s) tienen cinco o seis átomos de anillo.

60

Opcionalmente, los anillo(s) aromáticos pueden estar sustituidos. Si un sustituyente comprende un grupo arilo, este grupo arilo no se considera como parte del grupo arilo al que está unido. Por ejemplo, el grupo bifenilo se considera en el presente documento como un grupo fenilo (un grupo arilo que comprende un solo anillo aromático) sustituido con un grupo fenilo. De manera similar, el grupo bencilfenilo se considera como un grupo fenilo (un grupo arilo que comprende un solo anillo aromático) sustituido con un grupo bencilo.

65

En un grupo de realizaciones preferidas, el grupo aromático comprende un anillo aromático solo, que tiene cinco o seis átomos de anillo, los cuales se seleccionan entre carbono, nitrógeno, oxígeno, y azufre, y el anillo del cual está opcionalmente sustituido. Los ejemplos de estos grupos incluyen benceno, pirazina, pirrol, tiazol, isoxazol y oxazol. La 2-pirona también puede considerarse como un anillo aromático, pero es menos preferida.

ES 2 282 410 T3

Si el anillo aromático tiene seis átomos, entonces preferiblemente al menos cuatro, o incluso cinco o todos los átomos del anillo son carbono. Los otros átomos de anillo se seleccionan entre nitrógeno, oxígeno y azufre, siendo nitrógeno y oxígeno los preferidos. Los grupos apropiados incluyen un anillo con: ningún heteroátomo (benceno); un átomo de anillo de nitrógeno (piridina); dos átomos de anillo de nitrógeno (pirazina, pirimidina, y piridazina); un átomo de anillo de oxígeno (pirona); y átomo de anillo de oxígeno y uno de nitrógeno (oxazina).

Si el anillo aromático tiene cinco átomos, entonces preferiblemente al menos tres de los átomos del anillo son carbono. Los otros átomos de anillo se seleccionan entre nitrógeno, oxígeno y azufre. Los anillos apropiados incluyen un anillo con: un átomo de anillo de nitrógeno (pirrol); dos átomos de anillo de nitrógeno (imidazol, pirazol); un átomo de anillo de oxígeno (furano); un átomo de anillo de azufre (tiofeno); un átomo de anillo de nitrógeno y uno de azufre (isotiazol o tiazol); y un átomo de anillo de nitrógeno y uno de oxígeno (isoxazol o oxazol).

El anillo aromático puede llevar uno o más grupos sustituyentes en cualquier posición del anillo disponible. Estos sustituyentes se seleccionan de halo, nitrógeno, hidroxilo, éter, tiol, tioéter, amino, alquilo C₁₋₇, heterociclilo C₃₋₂₀ y arilo C₅₋₂₀. El anillo aromático también puede llevar uno o más grupos sustituyentes que juntos formen un anillo. En particular éstos pueden ser de fórmula -(CH₂)_m- o -O-(CH₂)_p-O-, donde m es 2, 3, 4 ó 5 y p es 1, 2 ó 3.

Alquilo C₁₋₇: Tal como se utiliza en el presente documento, el término “alquilo C₁₋₇” se refiere a una fracción monovalente que se obtiene al eliminar un átomo de hidrógeno de un compuesto hidrocarbonado C₁₋₇ que tiene de 1 a 7 átomos de carbono, que puede ser alifático o alicíclico, o una de sus combinaciones, y que puede ser saturado, parcialmente insaturado, o totalmente insaturado.

Los ejemplos de grupos alquilo C₁₋₇ lineales saturados (no sustituidos) incluyen, pero no se limitan a, metilo, etilo, n-propilo, n-butilo, y n-pentilo (amilo).

Los ejemplos de grupos alquilo C₁₋₇ ramificados saturados (no sustituidos) incluyen, pero no se limitan a, isopropilo, isobutilo, sec-butilo, terc-butilo, y neo-pentilo.

Los ejemplos de grupos alquilo C₁₋₇ alicíclicos (carbocíclicos) saturados (también denominados grupos “cicloalquilo C₃₋₇”) incluyen, pero no se limitan a, grupos no sustituidos tales como ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, y ciclohexilo, así como también grupos sustituidos (por ejemplo, grupos que comprenden dichos grupos), tales como metilciclopropilo, dimetilciclopropilo, metilciclobutilo, dimetilciclobutilo, metilciclopentilo, dimetilciclopentilo, metilciclohexilo, ciclopropilmetilo y ciclohexilmetilo.

Los ejemplos de grupos alquilo C₁₋₇ insaturados (no sustituidos) que tienen uno o más enlaces dobles carbono-carbono (también denominados grupos “alquenilo C₂₋₇”) incluyen, pero no se limitan a, etenilo (vinilo, -CH=CH₂), 2-propenilo (alilo, -CH₂-CH=CH₂), isopropenilo (-C(CH₃)=CH₂), butenilo, pentenilo, y hexenilo.

Los ejemplos de grupos alquilo C₁₋₇ insaturados (no sustituidos) que tienen uno o más enlaces triples carbono-carbono (también denominados grupos “alquinilo C₂₋₇”) incluyen, pero no se limitan a, etinilo (etinilo) y 2-propinilo (propargilo).

Los ejemplos de grupos alquilo C₁₋₇ alicíclicos (carbocíclicos) insaturados que tienen uno o más enlaces dobles carbono-carbono (también denominados grupos “cicloalquenilo C₃₋₇”) incluyen, pero no se limitan a, grupos no sustituidos tales como ciclopropenilo, ciclobutenilo, ciclopentenilo, y ciclohexenilo, así como también grupos sustituidos (por ejemplo, grupos que comprenden dichos grupos), tales como ciclopropenilmetilo y ciclohexenilmetilo.

Heterociclilo C₃₋₂₀: El término “heterociclilo C₃₋₂₀” tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a una fracción monovalente que se obtiene al eliminar un átomo de hidrógeno de un átomo de anillo de un compuesto heterocíclico C₃₋₂₀ no aromático, dicho compuesto con un anillo, o dos o más anillos (por ejemplo, espiro, fusionado o con puente) y que tiene de 3 a 20 átomos de anillo, de los cuales de 1 a 10 son heteroátomos de anillo, y donde al menos uno de dicho(s) anillo(s) es un átomo heterocíclico. Preferiblemente, cada anillo tiene de 3 a 7 átomos de anillo, de los cuales de 1 a 4 son heteroátomos de anillo. “C₃₋₂₀” se refiere a átomos de anillo, ya sean heteroátomos o átomos de carbono.

Los ejemplos de grupos heterociclilo C₃₋₂₀ con un átomo de nitrógeno incluyen, pero no se limitan a, aquellos que derivan de aziridina, azetidina, azetina, pirrolidina, pirrolina, piperidina, dihidropiridina, tetrahidropiridina, y dihidropirrol (azolina).

Los ejemplos de grupos heterociclilo C₃₋₂₀ con un átomo de oxígeno incluyen, pero no se limitan a, aquellos que derivan de oxirano, oxetano, oxolano (tetrahidrofuran), oxol (dihidrofuran), oxano (tetrahidropiran), dihidropiran, y pirano. Los ejemplos de grupos heterociclilo C₃₋₂₀ sustituidos incluyen azúcares, en forma cíclica, por ejemplo, furanosas y piranosas, incluyendo, por ejemplo, ribosa, lixosa, xilosa, galactosa, sacarosa, fructosa, y arabinosa.

Los ejemplos de grupos heterociclilo C₃₋₂₀ con un átomo de azufre incluyen, pero no se limitan a, aquellos que derivan del tiolano (tetrahidrotiofeno, tiano) y tetrahidrotiopiran.

Los ejemplos de grupos heterociclilo C₃₋₂₀ con dos átomos de oxígeno incluyen, pero no se limitan a, aquellos que derivan del dioxano, por ejemplo 1,3-dioxano y 1,4-dioxano.

ES 2 282 410 T3

Los ejemplos de grupos heterociclico C₃₋₂₀ con dos átomos de anillo de nitrógeno incluyen, pero no se limitan a, aquellos que derivan de la diazolidina (pirazolidina), pirazolina, imidazolidina, imidazolina, y piperacina.

5 Los ejemplos de grupos heterociclico C₃₋₂₀ con un átomo de anillo de nitrógeno y un átomo de anillo de oxígeno incluyen, pero no se limitan a, aquellos que derivan de tetrahidrooxazol, dihidrooxazol, tetrahidroisoxazol, dihidroisoxazol, morfolino, tetrahidrooxazina, dihidrooxazina, y oxazina.

10 Los ejemplos de grupos heterociclico C₃₋₂₀ con un átomo de anillo de azufre y un átomo de anillo de oxígeno incluyen, pero no se limitan a, aquellos que derivan de oxatolano y oxatiano.

15 Los ejemplos de grupos heterociclico C₃₋₂₀ con un átomo de anillo de azufre y un átomo de anillo de nitrógeno incluyen, pero no se limitan a, aquellos que derivan de tiazolina, tiazolidina, y tiomorfolina.

15 Otros ejemplos de grupos heterociclico C₃₋₂₀ incluyen, pero no se limitan a, oxadiazina.

20 Si el heterociclico C₃₋₂₀ está sustituido, los sustituyentes están sobre los átomos de carbono, o nitrógeno (en caso de estar presente).

20 Arilo C₅₋₂₀: El término “Arilo C₅₋₂₀” tal como se utiliza en la presente invención, se refiere a una fracción monovalente que se obtiene al eliminar un átomo de hidrógeno de un átomo de anillo aromático de un compuesto aromático C₅₋₂₀, dicho compuesto con un anillo, o dos o más anillos (por ejemplo, fusionados), y que tiene de 5 a 20 átomos de anillo, y donde al menos uno de dicho(s) anillo(s) es un anillo aromático. Preferiblemente, cada anillo tiene de 5 a 7 átomos de anillo.

25 Los átomos de anillo pueden ser átomos de carbono en su totalidad, como en los “grupos carboarilo”, en tal caso el grupo será convenientemente denominado como grupo “C₅₋₂₀ carboarilo”.

30 Los ejemplos de grupos arilo C₅₋₂₀ que no tienen heteroátomos de anillo (es decir, grupos carboarilo C₅₋₂₀) incluyen, pero no se limitan a, aquellos que derivan de benceno (es decir, fenilo) (C₆), naftaleno (C₁₀), antraceno (C₁₄), fenantreno (C₁₄), y pireno (C₁₆).

35 Alternativamente, los átomos de anillo pueden incluir uno o más heteroátomos, que incluyen, pero no se limitan a oxígeno, nitrógeno, y azufre, como en los “grupos heteroarilo”. En este caso, el grupo puede denominarse convenientemente como grupo “heteroarilo C₅₋₂₀”, donde “C₅₋₂₀” denota átomos de anillo, ya sean átomos de carbono o heteroátomos.

Preferiblemente, cada anillo tiene de 5 a 7 átomos de anillo, de los cuales de 0 a 4 son heteroátomos de anillo.

40 Los ejemplos de los grupos heteroarilo C₅₋₂₀ incluyen, pero no están limitados a, grupos C₅ heteroarilo derivados de furano (oxol), tiofeno (tiol), pirrol (azol), imidazol (1,3-diazol), pirazol (1,2-diazol), triazol, oxazol, isoxazol, tiazol, isotiazol, oxadiazol, oxatriazol, y tetrazol; y grupos heteroarilo C₆ derivados de isoxacina, piridina (azina), piridacina (1,2-diazina), pirimidina (1,3-diazina; por ejemplo, citosina, timina, uracilo), piracina (1,4-diazina), y triazina.

45 El grupo heteroarilo puede estar enlazado a través de un carbono o un heteroátomo de anillo.

45 Los ejemplos de grupos heteroarilo C₅₋₂₀ que comprenden anillos fusionados, incluyen, pero no están limitados a grupos heteroarilo C₉ derivados de benzofurano, isobenzofurano, benzotiofeno, indol, isoindol; Grupos heteroarilo C₁₀ derivados de quinolina, isoquinolina, benzodiacina, piridopiridina; Grupos heteroarilo C₁₄ derivados de acridina y xanteno.

50 Los grupos alquilo C₁₋₇, heterociclico C₃₋₂₀, y arilo C₅₋₂₀ de arriba, ya estén formando parte de otro sustituyente o estén presentes solos, pueden estar sustituidos con uno o más de los grupos seleccionados entre ellos mismos y los sustituyentes adicionales listados a continuación

55 Halógeno: -F, -Cl, -Br, y -I.

Hidroxilo: -OH.

60 Éter: -OR, donde R es un sustituyente éter, por ejemplo, un grupo alquilo C₁₋₇ (también denominado grupo alcoxilo C₁₋₇), un grupo heterociclico C₃₋₂₀ (también denominado grupo heterocicloxilo C₃₋₂₀), o un grupo arilo C₅₋₂₀ (también denominado grupo ariloxilo C₅₋₂₀), preferiblemente un grupo alquilo C₁₋₇.

Nitro: -NO₂.

65 Ciano (nitrilo, carbonitrilo): -CN.

Carbonilo: grupo con estructura -C(=O)-, que incluye acilo, caboxilo, éster y amido.

ES 2 282 410 T3

5 Acilo (ceto): $-C(=O)R$, donde R es un sustituyente de acilo, por ejemplo, un grupo alquilo C₁₋₇ (también denominado como alquilacilo C₁₋₇ o alcanoilo C₁₋₇), un grupo heterociclico C₃₋₂₀ (también denominado heterociclicilacilo C₃₋₂₀), o un grupo arilo C₅₋₂₀ (también denominado arilacilo C₅₋₂₀), preferiblemente un grupo alquilo C₁₋₇. Los ejemplos de grupos acilo incluyen, pero no se limitan a, $-C(=O)CH_3$ (acetilo), $-C(=O)CH_2CH_3$ (propionilo), $-C(=O)C(CH_3)_3$ (pivaloilo), y $-C(=O)Ph$ (benzoilo, fenona).

Carboxilo (ácido carboxílico): $-COOH$.

10 Éster (carboxilato, éster de ácido carboxílico, oxicarbonilo): $-C(=O)OR$, donde R es un sustituyente éster, por ejemplo, un grupo alquilo C₁₋₇, un grupo heterociclico C₃₋₂₀, o un grupo arilo C₅₋₂₀, preferiblemente un grupo alquilo C₁₋₇. Los ejemplos de grupos éster incluyen, pero no se limitan a, $-C(C=O)OCH_3$, $-C(=O)OCH_2CH_3$, $-C(=O)OC(CH_3)_3$, y $-C(=O)OPh$.

15 20 Amido (carbamolio, carbamilo, aminocabonilo, carboxamida): $-C(=O)NR^1R^2$, donde R¹ y R² son, independientemente, sustituyentes amino, como se define para los grupos amino. Los ejemplos de los grupos amido incluyen, pero no se limitan a, $-C(=O)NH_2$, $-C(=O)NHCH_3$, $-C(=O)N(CH_3)_2$, $-C(=O)NHCH_2CH_3$, y $-C(=O)N(CH_2CH_3)_2$, así como también grupos amido en los que R¹ y R² conjuntamente con el átomo de nitrógeno al que están enlazados, forman una estructura heterocíclica como en, por ejemplo, piperidinocarbonilo, morfolinocarbonilo, tiomorfolinocarbonilo, y piperazinocarbonilo.

25 30 Amino: $-NR^1R^2$, donde R¹ y R² son, independientemente, sustituyentes amino, por ejemplo, hidrógeno, un grupo alquilo C₁₋₇ (también denominado alquilamino C₁₋₇ o di-alquilamino C₁₋₇), un grupo heterociclico C₃₋₂₀, o un grupo arilo C₅₋₂₀, preferiblemente H o un grupo alquilo C₁₋₇, o, en el caso de un grupo amino “cíclico”, R¹ y R², conjuntamente con el átomo de nitrógeno al que están unidos, forman un anillo heterocíclico que tiene de 4 a 8 átomos de anillo. Los ejemplos de grupos amino incluyen, pero no se limitan a -NH₂, -NHCH₃, -NHCH(CH₃)₂, -N(CH₃)₂, -N(CH₂CH₃)₂, y -NHPH. Los ejemplos de grupos amino cíclicos incluyen, pero no se limitan a, aziridino, azetidino, pirrolidino, piperidino, piperacino, perhidrodiazepino, morfolino, y tiomorfolino. El anillo de los grupos amino cíclicos puede estar sustituido por cualquiera de los sustituyentes definidos aquí, por ejemplo carboxilo, carboxilato y amido. Una forma particular del grupo amino es donde uno de R¹ y R² es una sulfona (-S(=O)₂R), donde R es un sustituyente sulfona, y este grupo puede denominarse grupo sulfonamido. Los ejemplos de grupos sulfonamido incluyen, pero no están limitados a, NHS(=O)₂CH₃, -NHS(=O)₂Ph y -NHS(=O)₂C₆H₄F.

35 40 Acilamido (acilamino): $-NR^1C(=O)R^2$, donde R¹ es un sustituyente amido, por ejemplo, hidrógeno, un grupo alquilo C₁₋₇, un grupo heterociclico C₃₋₂₀, o un grupo arilo C₅₋₂₀, preferiblemente H o un grupo alquilo C₁₋₇, más preferiblemente H, y R² es un sustituyente acilo, por ejemplo, un grupo alquilo C₁₋₇, un grupo heterociclico C₃₋₂₀, o un grupo arilo C₅₋₂₀, preferiblemente un grupo alquilo C₁₋₇. Los ejemplos de los grupos acilamido incluyen, pero no se limitan a, $-NHC(=O)CH_3$, $-NHC(=O)CH_2CH_3$, y $-NHC(=O)Ph$. Una forma particular de grupo acilamido es en el que R² es un grupo amino (-NR³R⁴), donde R³ y R⁴ son, independientemente, sustituyentes amino, y este grupo puede denominarse como grupo ureido. Los ejemplos de grupos ureido incluyen, pero no se limitan a, $-NHC(=O)NHCH_3$, $-NHC(=O)NHCH_2CH_3$, y $-NHC(=O)NHPH$.

45 Aciloxilo (éster inverso): $-OC(=O)R$, donde R es un sustituyente aciloxilo, por ejemplo, un grupo alquilo C₁₋₇, un grupo heterociclico C₃₋₂₀, o un grupo arilo C₅₋₂₀, preferiblemente un grupo alquilo C₁₋₇. Los ejemplos de grupos aciloxilo incluyen, pero no se limitan a, $-OC(=O)CH_3$ (acetoxilo), $-OC(=O)CH_2CH_3$, $-OC(=O)C(CH_3)_3$, $-OC(=O)Ph$, $-OC(=O)CH_4F$, y $-OC(=O)CH_2Ph$.

Tiol: $-SH$.

50 55 Tioéter (sulfuro): $-SR$, donde R es un sustituyente tioéter, por ejemplo, un grupo alquilo C₁₋₇ (también denominado como grupo tioalquilo C₁₋₇), un grupo heterociclico C₃₋₂₀, o un grupo arilo C₅₋₂₀, preferiblemente un grupo alquilo C₁₋₇. Los ejemplos de grupos tioalquilo C₁₋₇ incluyen, pero no se limitan a, $-SCH_3$ y $-SCH_2CH_3$.

Sulfóxido (sulfinilo): $-S(=O)R$, donde R es un sustituyente sulfóxido, por ejemplo, un grupo alquilo C₁₋₇, un grupo heterociclico C₃₋₂₀, o un grupo arilo C₅₋₂₀, preferiblemente un grupo alquilo C₁₋₇. Los ejemplos de grupos sulfóxido incluyen, pero no se limitan a, $-S(=O)CH_3$ y $-S(=O)CH_2CH_3$.

60 Sulfona (sulfonilo): $-S(=O)_2R$, donde R es un sustituyente sulfona, por ejemplo, un grupo alquilo C₁₋₇, un grupo heterociclico C₃₋₂₀, o un grupo arilo C₅₋₂₀, preferiblemente un grupo alquilo C₁₋₇. Los ejemplos de grupos sulfona incluyen, pero no se limitan a, $-S(=O)_2CH_3$ (metanosulfonilo, mesilo), $-S(=O)_2CF_3$, $-S(=O)_2CH_2CH_3$, y 4-metilfenilsulfonilo (tosilo).

65 Como se menciona arriba, los grupos que forman los grupos de sustituyentes de arriba, por ejemplo alquilo C₁₋₇, heterociclico C₃₋₂₀ y arilo C₅₋₂₀, a su vez pueden estar sustituidos. Así, las definiciones de arriba cubren grupos de sustituyentes que están sustituidos.

ES 2 282 410 T3

Sustituyentes que Forman un Anillo

Es posible que un sustituyente en un anillo que forma parte de R_{C1} y un sustituyente en el anillo aromático fusionado (representado por -A-B-), conjuntamente puedan formar una unión intraanular, formando así otra estructura cíclica adicional en el compuesto.

El sustituyente en el anillo aromático que forma la unión intraanular está preferiblemente en el átomo adyacente a la especie central (es decir, en la posición α).

10 El sustituyente en R_{C1} que forma la unión intraanular está preferiblemente en el átomo que está separado un átomo del átomo que está enlazado la especie central.

La unión entre los dos anillos puede ser un enlace simple, o puede ser de fórmula:

15 $-(CH_2)_{n1'} - Q'_{n2'} - (CH_2)_{n3'} -$

donde cada uno de $n1'$, $n2'$ y $n3'$ se selecciona independientemente entre 0, 1, 2 y 3 y la suma de $n1'$, $n2'$ y $n3'$ es menor o igual a 3. Cada Q' (si $n2'$ es mayor a 1) se selecciona entre O, S, NR'_3 , $C(=O)$, o $-CR'_1R'_2-$, donde R'_1 y R'_2 se seleccionan independientemente entre hidrógeno, halógeno o alquilo C_{1-7} opcionalmente sustituido, o pueden formar un grupo alquilo C_{3-7} cíclico, que puede ser saturado (un grupo cicloalquilo C_{3-7}) o insaturado (un grupo C_{3-7} cicloalquenilo), conjuntamente con el átomo de carbono al que están unidos, y donde R'_3 se selecciona entre H o alquilo C_{1-7} .

25 *Preferencias Adicionales*

El anillo aromático fusionado representado por -A-B- puede estar sustituido, pero en algunas realizaciones preferiblemente no está sustituido.

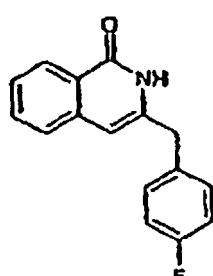
30 Si A y B representan conjuntamente un anillo benceno fusionado sustituido, preferiblemente el sustituyente no forma una unión intraanular con un sustituyente que forma parte de R_C . Los sustituyentes en la posición cinco son particularmente preferidos.

35 Donde sea apropiado, las preferencias de arriba pueden tomarse como combinaciones de una con otra.

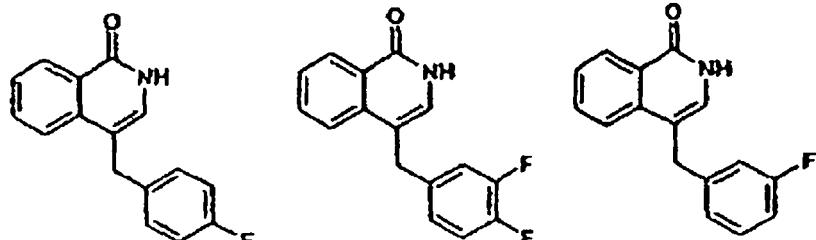
Compuestos Preferidos

Los siguientes compuestos son realizaciones preferidas del primer aspecto de la invención:

40

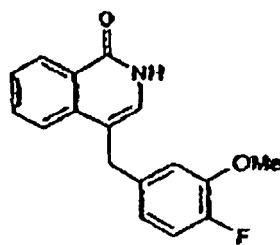


55



5

10



Otras Formas Incluidas

En los compuestos de arriba se incluyen las formas iónicas, sales, solvatos, y protegidas conocidas de estos sustituyentes. Por ejemplo, una referencia al ácido carboxílico (-COOH) también incluye la forma aniónica (-COO^-) (carboxilato), su sal o solvato, así como también las formas protegidas convencionales. De manera similar, una referencia a un grupo amino incluye la forma protonada ($\text{(-N}^+\text{HR}^1\text{R}^2)$), una sal o solvato del grupo amino, por ejemplo, una sal de cloruro de hidrógeno, así como también las formas protegidas convencionales de un grupo amino. De manera similar, una referencia a un grupo hidroxilo también incluye la forma aniónica (-O^-), una de sus sales o solvatos, así como también las formas protegidas convencionales de un grupo hidroxilo.

Tautómeros, Sales, Solvatos

Ciertos compuestos pueden existir en una o más formas tautoméricas particulares, incluyendo pero sin limitarse a, las formas ceto, enol, y enolato.

Si el compuesto está en forma cristalina puede existir en varias formas polimórficas diferentes.

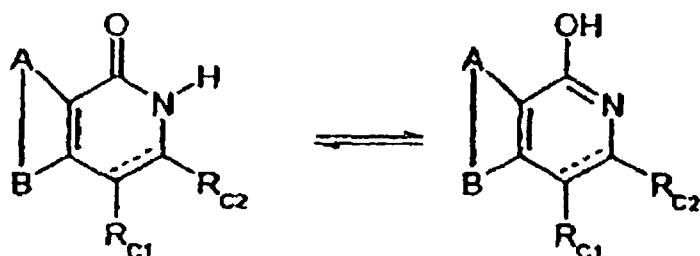
Los ejemplos de formas tautoméricas incluyen las formas ceto, enol, y enolato, por ejemplo, como en las siguientes parejas tautoméricas: ceto/enol, imina/enamina, amida/alcohol imino, amidina/amidina, nitroso/oxima, tiocetona/enetiol, N-nitroso/hiroxiazo (“*hyroxyazo*”), y nitro/aci-nitro.

La pareja tautomérica particularmente relevante para la presente invención es la pareja tautomérica que existe cuando R_N es H, mostrada a continuación:

35

40

45



50

Los compuestos pueden tener una o más sustituciones isotópicas. Por ejemplo, H puede estar en cualquier forma isotópica, incluyendo ^1H , ^2H (D), y ^3H (T); C puede estar en cualquier forma isotópica, incluyendo ^{12}C , ^{13}C , y ^{14}C ; O puede estar en cualquier forma isotópica, incluyendo ^{16}O y ^{18}O ; y similares.

Menos cuando se especifica lo contrario, una referencia a un compuesto en particular también incluye sus formas iónicas, sales y solvatos, por ejemplo, como se describe abajo.

55

Puede ser conveniente o deseable preparar, purificar, y/o manipular una de las sales correspondientes al principio activo, por ejemplo, una sal farmacéuticamente aceptable. Los ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables se discuten en Berge *et al.*, 1977, “Pharmaceutically Acceptable Salts”, *J. Pharm. Sci.*, Vol. 66, pp. 1-19.

60

65

Por ejemplo, si el compuesto es aniónico, o si tiene un grupo funcional que puede ser aniónico (por ejemplo, -COOH que puede ser -COO^-), entonces una sal puede formarse con un catión apropiado. Los ejemplos de los cationes inorgánicos apropiados incluyen, pero no se limitan a, iones alcalinos metálicos como Na^+ y K^+ , cationes alcalinotérreos tales como Ca^{2+} y Mg^{2+} , y otros cationes tales como Al^{3+} . Los ejemplos de cationes orgánicos apropiados incluyen, pero no se limitan a, el ión amonio (es decir, NH_4^+) y iones amonio sustituidos (por ejemplo, NH_3R^+ , NH_2R_2^+ , NHR_3^+ , NR_4^+). Los ejemplos de algunos iones amonio apropiados sustituidos son aquellos derivados de: etilamina, dietilamina, diciclohexilamina, trietilamina, butilamina, etilendiamina, etanolamina, dietanolamina, pipericina, bencilamina, fenilbencilamina, colina, meglúmina, y trometamina, así como también aminoácidos, tales como lisina y arginina. Un ejemplo de un ion amonio cuaternario es $\text{N}(\text{CH}_3)_4^+$.

ES 2 282 410 T3

Si el compuesto es catiónico, o tiene un grupo funcional que puede ser catiónico (por ejemplo, -NH_2 puede ser NH_3^+), entonces puede formarse una sal con un anión apropiado. Los ejemplos de aniones inorgánicos apropiados incluyen, pero no se limitan a, aquellos que derivan de los siguientes ácidos inorgánicos: clorhídrico, bromhídrico, yodhídrico, sulfúrico, sulfuroso, nítrico, nitroso, fosfórico, y fosforoso. Los ejemplos de aniones orgánicos apropiados incluyen, pero no se limitan a, aquellos que derivan de los siguientes ácidos orgánicos: acético, propiónico, succínico, glicólico, esteárico, palmítico, láctico, mágico, pamoico, tartárico, cítrico, glucónico, ascóbico, maleico, hidroximálico, fenilacético, glutámico, aspártico, benzoico, cinámico, pirtívico, salicílico, sulfanílico, 2-acetoxibezoico, fumárico, toluensulfónico, metanosulfónico, etanosulfónico, etanodisulfónico, oxálico, isetónico, valérico, y glucónico. Los ejemplos de aniones poliméricos apropiados incluyen, pero no se limitan a, aquellos derivados de los siguientes ácidos poliméricos: ácido tánico, carboximetilcelulosa.

Puede ser conveniente o deseable preparar, purificar, y/o manipular un solvato correspondiente al principio activo. El término solvato se utiliza en el presente documento en su sentido convencional para referirse a un complejo de soluto (por ejemplo, principio activo, sal del principio activo) y un disolvente. Si el disolvente es agua, el solvato 15 puede denominarse como un hidrato, por ejemplo, un monohidrato, un dihidrato, un trihidrato, etc.

Acrónimos

Por comodidad, muchos de las especies químicas se representan utilizando abreviaturas conocidas, incluyendo 20 pero no limitándose a, metilo (Me), etilo (Et), *n*-propilo (nPr), isopropilo (iPr), *n*-butilo (nBu), *terc*-butilo (tBu), *n*-hexilo (nHex), ciclohexilo (cHex), fenilo (Ph), bifenilo (biPh), bencilo (Bn), naftilo (naph), metoxilo (MeO), etoxilo (EtO), benzoilo (Bz), y acetilo (Ac).

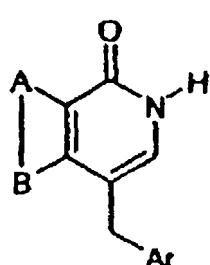
Por comodidad, muchas de las especies químicas se representan utilizando abreviaturas conocidas, incluyendo pero 25 sin limitarse a, metanol (MeOH), etanol (EtOH), isopropanol (i-PrOH), metiletilcetona (MEK), éter o dietileter (Et₂O), ácido acético (AcOH), diclorometano (cloruro de metileno, DCM), ácido trifluoroacético (TFA), dimetilformamida (DMF), tetrahidrofurano (THF), y dimetilsulfóxido (DMSO).

Síntesis

Los compuestos tal como se describen en el primer aspecto de la invención pueden sintetizarse mediante varios 30 métodos, a continuación se dan ejemplos de algunos de ellos.

Los artículos a continuación proporcionan rutas de síntesis de compuestos dentro de la clase general descrita 35 (donde Ar=Arilo C₅₋₂₀).

I.W. Elliott y Y. Takekoshi, J. Heterocyclic Chem., 1976, 13, 597.

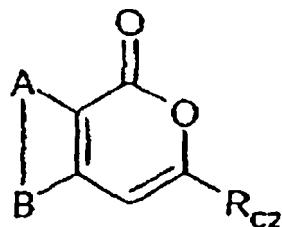


El anillo aromático que se forma (representado por -A-B-) normalmente se modifica antes de las etapas principales 50 de síntesis, y los materiales de partida con la estructura y el patrón de sustitución deseados son comerciales o son fácilmente sintetizables.

Se pueden llevar a cabo modificaciones adicionales de los grupos R_{C1} y R_{C2} utilizando métodos convencionales.

Síntesis de isoquinolinonas 3-sustituidas

Los compuestos de la presente invención en los que R_{C1} es H y R_{C2}, A y B se definen como en el primer aspecto 60 de la invención y el enlace que une las posiciones 3 y 4 es un enlace doble, puede sintetizarse mediante reacción de un compuesto de Fórmula 1:



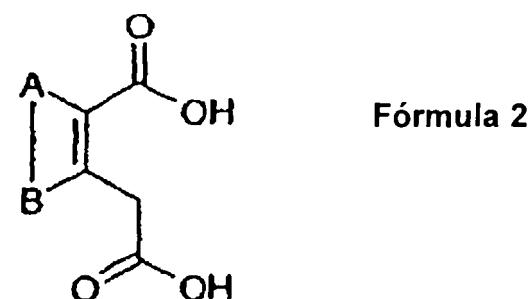
10

en la cual R_{C2} , A y B son como se han definido previamente, con amonio (NH_3) a una temperatura en el rango de 100-200°C, opcionalmente en un recipiente sellado para generar una presión elevada, opcionalmente en presencia de un disolvente, por ejemplo metanol.

15

Los compuestos de Fórmula 1 pueden sintetizarse mediante reacción de un compuesto de Fórmula 2:

20



en la cual A y B son como se definen arriba, con un compuesto de fórmula $R_{c2}COX$, en el que R_{c2} está definido arriba y X es un grupo saliente, por ejemplo un halógeno tal como cloruro, a una temperatura en el intervalo de 100-250°C, opcionalmente en presencia de un disolvente, por ejemplo xileno.

35

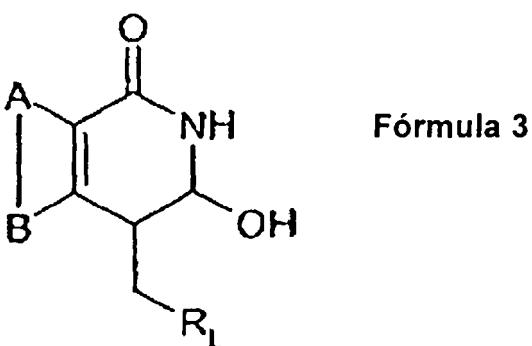
Los compuestos de Fórmula 2 son comerciales o pueden ser sintetizados fácilmente mediante métodos conocidos.

Síntesis de isoquinolinonas 4-sustituidas

40

Los compuestos de la presente invención en los que R_{C1} es un grupo arilalquilo de Fórmula $-CH_2R_L-$ en el que R_L se define como en el primer aspecto de la invención, R_{C2} es H y A y B se definen como en el primer aspecto de la invención y el enlace que une las posiciones 3 y 4 es un enlace doble, pueden sintetizarse mediante la reacción de un compuesto de Fórmula 3:

45



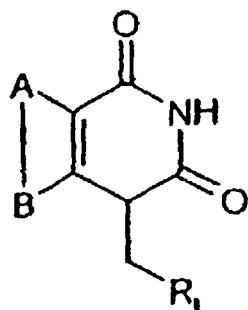
60

en la cual A, B y R_L son como se han definido previamente, con un agente deshidratante, por ejemplo ácido toluen-4-sulfónico, a una temperatura en el intervalo de 20-150°C, opcionalmente en presencia de un disolvente, por ejemplo tolueno.

65

ES 2 282 410 T3

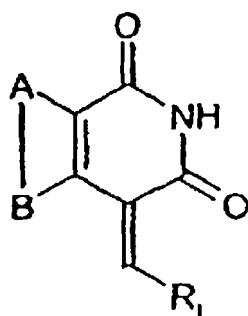
Los compuestos de Fórmula 3 pueden sintetizarse mediante reacción de un compuesto de Fórmula 4:



Fórmula 4

en la cual A, B y R_L están definidos como anteriormente con un agente reductor, por ejemplo una fuente de hidrógeno como el hidrógeno de boro y sodio, en un disolvente, por ejemplo metanol, a una temperatura en el intervalo de -20°C hasta el punto de ebullición del disolvente elegido.

20 Los compuestos de Fórmula 4 pueden sintetizarse mediante la reducción de un compuesto de Fórmula 5:

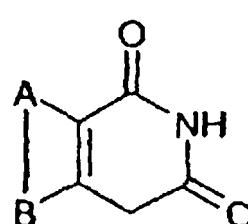


Fórmula 5

en la cual A, B y RL son como se definen previamente con un compuesto reductor, por ejemplo hidrógeno, en presencia de un catalizador apropiado, por ejemplo paladio-carbono, en presencia de un disolvente, por ejemplo metanol, a una temperatura en el intervalo de 20°C hasta el punto de ebullición del disolvente elegido, opcionalmente bajo presión elevada.

40 Los compuestos de Fórmula 3 pueden sintetizarse directamente a partir de compuestos de Fórmula 5 mediante la reacción con un agente reductor, por ejemplo un fuente de hidrógeno como es el hidrógeno de boro y sodio, en un disolvente, 45 por ejemplo metanol, a una temperatura en el intervalo de -20°C hasta el punto de ebullición del disolvente elegido.

Los compuestos de Fórmula 5 pueden sintetizarse mediante reacción de un compuesto de Fórmula 6:



Fórmula 6

60 en la cual A y B son como se definen arriba, con un carbonilo de fórmula R_LCHO, en el que R_L está definido arriba en presencia de una base, por ejemplo piperidina, opcionalmente en presencia de un disolvente, por ejemplo ácido acético, a una temperatura en un intervalo de 20°C hasta el punto de ebullición del disolvente escogido.

65 Los compuestos de Fórmula 6 pueden sintetizarse mediante la reacción de un compuesto de Fórmula 2 con urea a una temperatura en el intervalo de 150-190°C.

ES 2 282 410 T3

Uso

La presente invención proporciona compuestos activos específicamente en la inhibición de la actividad de la PARP.

5 El término “activo”, tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a compuestos que tienen la capacidad de inhibir la actividad de la PARP, e incluye específicamente tanto compuestos con actividades intrínsecas (fármacos) como también profármacos de tales compuestos, estos profármacos por sí solos pueden mostrar una actividad intrínseca pequeña o nula.

10 En los ejemplos a continuación se describe un ensayo que puede utilizarse de manera conveniente para evaluar la inhibición de la PARP provocada por un compuesto determinado.

Por ejemplo, se puede cultivar *in vitro* una muestra de células y ponerlas en contacto con un principio activo, y observar el efecto del compuesto en esas células. Como ejemplo de “efecto” puede determinarse la extensión del efecto de reparación del ADN en un tiempo determinado. Cuando resulta que el principio activo tiene efecto en las células, éste puede utilizarse como marcador pronóstico o diagnóstico de la eficacia del compuesto en métodos de tratamiento de un paciente que porta células del mismo tipo celular.

20 El término “adyuvante” se utiliza en el presente documento en relación con el uso de compuestos activos en conjunción con medios terapéuticos conocidos. Tales medios incluyen regímenes citotóxicos de fármacos y/o radiación ionizante de la manera que se utilizan en el tratamiento de diferentes tipos de cáncer.

25 El término “cantidad terapéuticamente efectiva”, tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a aquella cantidad de principio activo, o de material, composición o forma de dosificación que comprende un principio activo, que produce algún efecto terapéutico deseado, acorde con una relación beneficio/riesgo razonable.

Los compuestos activos también pueden utilizarse como aditivos para cultivo celular para inhibir la PARP, por ejemplo, para radiosensibilizar células a tratamientos químicos o de radiación ionizante *in vitro*.

30 Los compuestos activos también pueden utilizarse como parte de un ensayo *in vitro*, por ejemplo, para determinar qué hospedador candidato puede beneficiarse de un tratamiento con el compuesto en cuestión.

Administración

35 El principio activo o la composición farmacéutica que comprende el principio activo puede administrarse a un sujeto mediante cualquier vía de administración apropiada, ya sea sistémica/periférica o en el lugar de la acción deseada, incluyendo pero no limitándose a, oral (por ejemplo, mediante ingestión); tópica (incluyendo, por ejemplo, transdérmica, intranasal, ocular, bucal, y sublingual); pulmonar (por ejemplo, mediante terapia de inhalación o insuflación utilizando, por ejemplo, un aerosol, por ejemplo, a través de la boca o nariz); rectal; vaginal; parenteral, por ejemplo, mediante inyección, incluyendo subcutánea, intradérmico, intramuscular, intravenoso, intraarterial, intracardíaco, intratecal, intraespinal, intracapsular, subcapsular, intraorbitario, intraperitoneal, endotraqueal, subcuticular, intraarticular, subaracnoideo, e intraesternal; mediante el implante de un reservorio, por ejemplo, subcutáneamente o intramuscularmente.

45 El sujeto puede ser un eucariota, un animal, un animal vertebrado, un mamífero, un roedor (por ejemplo, un cerdo de guinea, un hámster, una rata, un ratón), múrido (por ejemplo un ratón), canino (por ejemplo, un perro), felino (por ejemplo, un gato), equino (por ejemplo, un caballo), un primate, un simio (por ejemplo, un mono o simio antropomorfo), un mono (por ejemplo, tití, babuino), un simio antropomorfo (por ejemplo, gorila, chimpancé, orangután, gibón), o un humano.

Formulaciones

50 Aunque el principio activo puede ser administrado solo, es preferible presentarlo como una composición farmacéutica (por ejemplo, Formulación) que comprende al menos un principio activo, como se define arriba, con uno o más portadores farmacéuticamente aceptables, adyuvantes, excipientes, diluyentes, agente de relleno, tampones, estabilizantes, conservantes, lubricantes, u otros materiales conocidos por el experto en la materia y opcionalmente otros agentes terapéuticos o profilácticos.

55 Así, la presente invención además proporciona composiciones farmacéuticas, como se definen arriba, y métodos de preparación de una Formulación farmacéutica que comprende mezclar al menos un principio activo, como se define arriba, junto con uno o más portadores farmacéuticamente aceptables, adyuvantes, excipientes, tampones, estabilizantes, u otros materiales conocidos, como se describe en el presente documento.

60 El término “farmacéuticamente aceptable”, tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a compuestos, materiales, composiciones, y/o formas de dosificación que son, según un criterio médico válido, apropiados para el uso en contacto con los tejidos de un individuo (por ejemplo, un humano) sin una excesiva toxicidad, irritación, respuesta alérgica, u otros problemas o complicaciones, con un balance beneficio/riesgo razonable. Cada portador, excipiente, etc. también debe ser “aceptable” en el sentido de ser compatible con los demás ingredientes de la formulación.

ES 2 282 410 T3

Los portadores, excipientes, etc. apropiados pueden encontrarse en textos farmacéuticos comunes, por ejemplo, *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18th edition, Mack Publishing Company, Easton, Pa., 1990.

- Las formulaciones pueden presentarse de manera conveniente en forma de dosificación unitaria y pueden prepararse mediante cualquier método conocido en la técnica farmacéutica. Tales métodos incluyen la etapa de asociar el principio activo con el portador que constituye uno o más de los ingredientes accesorios. En general, las formulaciones se preparan asociando íntimamente y de manera uniforme el principio activo con portadores líquidos o portadores sólidos finamente divididos o ambos, y cuando es necesario dando forma al producto.
- Las formulaciones pueden estar en forma de líquidos, soluciones, suspensiones, emulsiones, elixires, jarabes, sirupos, comprimidos, comprimidos para disolver en la boca, gránulos, polvo, cápsulas, sobres, píldoras, ampollas, supositorios, pesarios, pomadas, geles, pastas, cremas, sprays, vaporizados, espumas, lociones, bolos, grageas, o aerosoles.
- Las formulaciones apropiadas para la administración oral (por ejemplo, mediante ingestión) pueden presentarse como unidades diferenciadas como son cápsulas, sobres o comprimidos, cada uno de ellos conteniendo una cantidad predeterminada del principio activo; como polvo o gránulos; como una solución o suspensión en un líquido acuoso o no acuoso; o como una emulsión líquida de aceite en agua o una emulsión líquida de agua en aceite; como un bolo; como una gragea; o como una pasta.
- Un comprimido puede fabricarse mediante métodos convencionales, por ejemplo, compresión o moldeo, opcionalmente con uno o más ingredientes adicionales. Los comprimidos pueden prepararse en una máquina apropiada mediante la compresión del principio activo en forma fluida tal como polvo o granulado, opcionalmente mezclado con uno o más aglutinantes (por ejemplo, povidona, gelatina, acacia, sorbitol, tragacanto, hidroxipropilmetilcelulosa); agentes de relleno (por ejemplo, lactosa, celulosa microcristalina, hidrogenofosfato de calcio); lubricantes (por ejemplo, estearato de magnesio, talco, sílice); desintegrantes (por ejemplo, almidón glicolato de sodio, crospovidona, croscarmelosa de sodio); agentes superficiales o dispersantes o agentes humectantes (por ejemplo, laurilsulfato de sodio); y conservantes (por ejemplo, p-hidroxibenzoato de metilo, p-hidroxibenzoato de propilo, ácido sóblico). Los comprimidos moldeados pueden fabricarse en una máquina apropiada mediante el moldeado del compuesto en forma de polvo humedecido con un diluyente líquido inerte. Los comprimidos opcionalmente pueden estar recubiertos o hendidos y pueden estar formulados para proporcionar una liberación controlada o retardada del principio activo que contienen utilizando, por ejemplo, hidroxipropilmetilcelulosa en diferentes proporciones para proporcionar el perfil de liberación deseado. Opcionalmente, los comprimidos pueden proporcionarse con un recubrimiento entérico, para que la liberación del fármaco se produzca en otras zonas del tracto digestivo diferentes al estómago.
- Las formulaciones apropiadas para la administración tópica (por ejemplo transdérmica, intranasal, ocular, bucal y sublingual) pueden estar formuladas en forma de pomada, crema, suspensión, loción, polvo, solución, pasta, gel, spray, aerosol, o aceite. Alternativamente, una formulación puede comprender un parche o soporte tal como una venda o una tira adhesiva impregnada con compuestos activos y opcionalmente uno o más excipientes o diluyentes.
- Las formulaciones apropiadas para la administración tópica en la boca incluyen pastillas para disolver en la boca que comprenden el principio activo y un soporte aromatizado, generalmente sacarosa y acacia o tragacanto; pastillas que comprenden el principio activo en un soporte inerte tal como gelatina y glicerina, o sacarosa y acacia; y enjuagues bucales que comprenden el principio activo en un portador líquido apropiado.
- Las formulaciones apropiadas para la administración tópica en el ojo incluyen gotas oftálmicas donde los compuestos activos se disuelven o se suspenden en un portador apropiado, especialmente un disolvente acuoso del principio activo.
- Las formulaciones apropiadas para la administración nasal, donde el portador es un sólido, incluye un polvo grueso con un tamaño de partícula, por ejemplo, en el intervalo de aproximadamente 20 a 500 micras que se administra de la manera que se consume rapé, es decir, mediante la rápida inhalación a través del conducto nasal del polvo desde un recipiente sujeto cerca de la nariz. Formulaciones apropiadas donde el portador es un líquido para la administración en forma de, por ejemplo, spray nasal, gotas nasales, o mediante la administración en forma de aerosol mediante un nebulizador, incluyen soluciones acuosas u oleosas del principio activo.
- Las formulaciones apropiadas para la administración mediante la inhalación incluyen las presentadas como spray aerosol en recipiente presurizado, con la utilización de un propelente adecuado, como es diclorofluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono, u otros gases apropiados.
- Las formulaciones apropiadas para la administración tópica a través de la piel incluyen pomadas, cremas y emulsiones. Cuando se formula como pomada, el principio activo opcionalmente puede utilizarse tanto con una base cremosa parafínica o acuosa. Alternativamente, los compuestos activos pueden formularse en una crema con una base de aceite en agua. Si se desea, la fase acuosa de la base cremosa puede incluir, por ejemplo, al menos aproximadamente el 30% p/p de un alcohol polihídrico, es decir, un alcohol con dos o más grupos hidroxilo tales como propilenglicol, 1,3-butanodiol, manitol, sorbitol, glicerol y polietilenglicol y sus mezclas. Las formulaciones tópicas pueden incluir un compuesto que mejore la absorción o la penetración del principio activo a través de la piel u otras áreas afectadas. Los ejemplos de tales potenciadores de la penetración dérmica incluyen el dimetilsulfóxido y análogos relacionados.

ES 2 282 410 T3

Cuando se formula como emulsión tópica, la fase oleosa opcionalmente puede comprender únicamente un emulsionante (también denominado emulgente), o puede comprender una mezcla de al menos un emulsionante con una grasa o un aceite o con ambos. Preferiblemente, se incluye un emulsionante hidrofílico junto con un emulsionante lipofílico que actúa como estabilizante. También se prefiere incluir un aceite y una grasa. A la vez, el/los emulsionante/s con o sin estabilizante(s) conforman la denominada cera emulsionante, y la cera conjuntamente con el aceite y/o

la grasa conforman la denominada base emulsionante para cremas que forma la fase oleosa dispersada de las formulaciones cremosas. Los emulgentes y estabilizantes de la emulsión apropiados incluyen Tween 60, Span 80, alcohol cetoestearílico, alcohol mirístico, monoestearato de glicerilo y laurilsulfato de sodio. La elección de los aceites o grasas apropiados para la formulación se basa en la capacidad para alcanzar las propiedades cosméticas deseadas, ya que la solubilidad del principio activo puede ser muy baja en muchos de los aceites que podrían utilizarse en formulaciones farmacéuticas en forma de emulsión. Así, la crema preferiblemente debería ser un producto no graso, que no manche y lavable, con una consistencia apropiada para evitar pérdidas en tubos u otros recipientes. Pueden utilizarse ésteres de alquilo de cadena lineal o ramificada, mono o dibásicos, tales como el di-isoadipato, isocetilestearato, propilenglicoldiéster de ácidos grasos de coco, mirístico de isopropilo, deciloleato, palmitato de isopropilo, estearato de butilo, palmitato de 2-ethylhexilo o una mezcla de ésteres de cadena ramificada conocida como Crodamol CAP, los tres últimos son ésteres preferidos. Éstos pueden utilizarse solos o en combinación dependiendo de las propiedades requeridas. Alternativamente, pueden utilizarse lípidos de punto de fusión alto tales como parafina blanca suave y/o parafina líquida u otros aceites minerales.

Las formulaciones apropiadas para administración rectal pueden presentarse como supositorio con una base apropiada que comprende, por ejemplo, manteca de coco o un salicilato.

Las formulaciones apropiadas para administración vaginal pueden presentarse como pesarios, tampones, cremas, geles, espumas o formulaciones en spray que contienen, además del principio activo, portadores como los que se saben apropiados en el estado de la técnica.

Las formulaciones apropiadas para administración parenteral (por ejemplo, mediante inyección, incluyendo cutánea, subcutánea, intramuscular, intravenosa e intradérmica), incluye soluciones para inyección isotónicas acuosas y no acuosas, libres de pirógenos, estériles, que pueden contener antioxidantes, tampones, conservantes, estabilizantes, bacteriostáticos, y solutos que otorgan a la formulación la isotonicidad respecto a la sangre del receptor previsto; y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes de suspensión y espesantes, y liposomas u otros sistemas microparticulados que están diseñados para dirigir el compuesto a los componentes sanguíneos o a uno o más órganos. Los ejemplos de vehículos isotónicos apropiados para el uso en tales formulaciones incluyen Sodium Chloride Injection, Solución de Ringer, o Inyección Lactated de Ringer. Generalmente, la concentración del principio activo en la solución es de aproximadamente 1 ng/ml a aproximadamente 10 µg/ml, por ejemplo de aproximadamente 10 ng/ml a aproximadamente 1 µg/ml. Las formulaciones pueden presentarse en recipientes monodosis o multidosis sellados, por ejemplo en ampollas y viales, y pueden almacenarse en forma de liofilizado sólo necesitando la adición de un portador líquido estéril, por ejemplo agua para inyecciones, inmediatamente antes de su uso. Las soluciones y suspensiones extemporáneas para inyección pueden prepararse a partir de polvo estéril, gránulos, y pastillas. Las formulaciones pueden estar en forma de liposomas u otros sistemas de micropartículas que estén diseñados para dirigir el compuesto a componentes sanguíneos o a uno o más órganos.

Dosis

Se entiende que la dosis apropiada de los compuestos activos, y las composiciones que comprenden los compuestos activos, pueden variar entre pacientes. La determinación de la dosis óptima implica generalmente el equilibrio entre el nivel del beneficio terapéutico y cualquier riesgo o efecto secundario de los tratamientos de la presente invención. El nivel de dosificación seleccionado dependerá de varios factores, incluyendo, pero sin limitarse a, la actividad de un compuesto en particular, la vía de administración, el tiempo de administración, la velocidad de excreción del compuesto, la duración del tratamiento, otros fármacos, compuestos, y/o materiales que se utilizan en combinación, y la edad, sexo, peso, condición, estado de salud, y el historial médico anterior del paciente. En último lugar, la cantidad de compuesto y la vía de administración están a discreción del médico, aunque en general la dosificación será la que provoque concentraciones locales en el lugar de acción y que consiga el efecto deseado sin causar efectos secundarios dañinos o perniciosos.

La administración *in vivo* puede llevarse a cabo en una dosis, continua o intermitentemente (por ejemplo en dosis divididas en los intervalos apropiados) durante el curso del tratamiento. Los métodos para la determinación de las vías y dosis de administración más apropiadas son conocidos por el experto de la materia y variarán en función de la formulación utilizada para la terapia, el objetivo de la terapia, la célula diana a tratar, y el individuo a tratar. La administración puede ser única o múltiple con la dosificación y el patrón seleccionado por el médico.

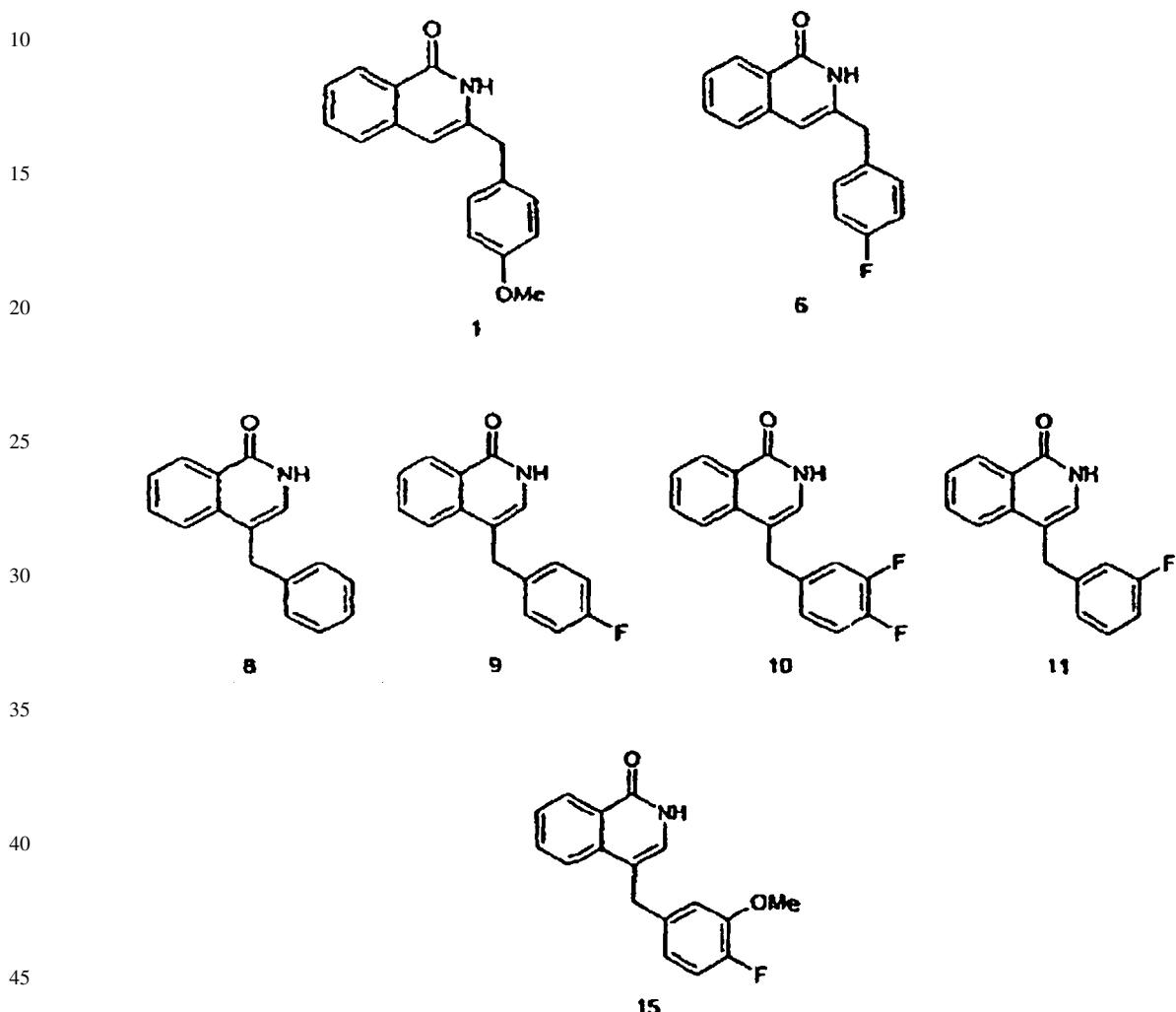
Generalmente, una dosis apropiada del principio activo está en el intervalo de aproximadamente 100 µg a aproximadamente 250 mg por kilogramo de peso corporal del individuo al día. Donde el principio activo es una sal, un éster, profármaco, o similares, la cantidad a administrar se calcula en base al compuesto original y por tanto el peso utilizado se incrementa proporcionalmente.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos ilustran la presente invención.

5 *Datos de Síntesis*

Los compuestos a continuación se sintetizaron utilizando las rutas detalladas a continuación:

**Síntesis de isoquinolinonas 3-sustituidas**

50 *Compuesto de Referencia 1 (R_{c2} = 4-metoxibencilo, R_{c1} =H)*

Etapa 1

55 Una mezcla bien agitada de ácido homoftálico (10 g; 56 mmol) y cloruro de 2-(4-metoxifenilo)acetilo (10 g, 230 mmol) se calentó a 200°C durante 3 horas bajo nitrógeno y a continuación se enfrió a 50°C y se disolvió en tolueno (100 ml). El disolvente se eliminó mediante vacío y el residuo se disolvió en metanol (100 ml). Se añadió sílice (30 g) y se eliminó el disolvente mediante vacío. El producto crudo, adsorbido en el sílice, se aplicó a la parte superior de una columna de sílice y se purificó mediante cromatografía utilizando mezclas al 10-50% de acetato de etilo y hexano como eluente. Se combinaron las fracciones adecuadas y los disolventes se eliminaron mediante vacío para dar 3-(4-metoxibencilo)isocumarina (0,9 g, 26%) en forma de aceite; δ H 3,75 (3H, s), 3,80 (2H, s), 6,50 (1H, s), 6,95 (2H, d, J =8,9 Hz), 7,30 (2H, d, J =8,9 Hz), 7,40-7,90 (3H, m), 8,10 (1H,d); m/z (M+H)⁺ 267.

Etapa 2

65 Una suspensión agitada de 3-(4-metoxibencilo)isocumarina (0,35 g, 1,3 mmol) en una solución etanólica al 15% de amonio (100 ml) se calentó a 150°C en un autoclave de 300 ml durante 5 horas y a continuación se enfrió hasta temperatura ambiente. El sólido resultante se recogió mediante filtración, se lavó con una pequeña cantidad de metanol

ES 2 282 410 T3

frío y se secó mediante vacío para dar 3-(4-metoxibencilo)-1-isoquinolinona (0,04 g, 12%) en forma de sólido; p.f. 216-218°C; δ_H 3,80 (3H, s), 3,85 (2H, s), 6,25 (1H, s), 6,90 (2H, d, $J=8,2$ Hz), 7,30 (2H, d), 7,30-7,60 (3H, m), 8,20 (1H, d), 11,20 (1H, br s); m/z (M+H)⁺ 266 (Pureza 100%).

- 5 El compuesto 6 se preparó de manera similar a la descrita arriba para el Compuesto 1:

Compuesto 6 ($R_{C_2} = 4$ -fluorobencilo, $R_{C_1} = H$)

Etapa 1

10 3-(4-fluorobencilo)isocumarina. Rendimiento, 29%; aceite; δ_H 3,80 (2H, s), 6,30 (1H, s), 7,00-7-70 (7H, m), 8,25 (1H, d).

15 Etapa 2

15 3-(4-Fluorobencilo)-1-isoquinolinona. Rendimiento, 79%; p.f. 238-240°C; δ_H 3,80 (2H, s), 6,40 (1H, s), 7,00-7,60 (7H, m), 8,15 (1H, d), (11,30 (1H, br s.); m/z (M+H)⁺ 254.

Síntesis de isoquinolinonas 4-sustituidas

20 *Compuesto de Referencia 8 ($R_{C_1} = bencilo$, $R_{C_2} = H$)*

Etapa 1

25 Se pulverizó una mezcla de ácido homoftálico (200 g, 1,09 mol) y urea (80 g, 1,31 mol) hasta conseguir polvo fino, a continuación se calentó a 175-185°C hasta que se fundió y entonces se resolidificó. La mezcla se enfrió hasta temperatura ambiente, se añadió metanol (500 ml), a continuación se calentó la mezcla a reflujo durante 20 minutos, se filtró, y se dejó enfriar hasta temperatura ambiente. El sólido resultante se recogió mediante filtración, se lavó con metanol y se secó mediante vacío para dar homoftalimida (60 g, 34%) en forma de sólido; p.f. 235-240°C; δ_H 4,0 (2H, s), 7,3-7,75 (3H, m), 8,10 (1H, d), 11,20 (1H, br s.).

Etapa 2

35 Una suspensión agitada de homoftalimida (15 g, 93 mmol), benzaldehido (9,9 g, 93 mmol), piperidina (9 ml) y ácido acético (465 ml) se calentó a reflujo durante 1 hora, se enfrió a temperatura ambiente y se diluyó con agua (500 ml). El sólido resultante se recogió mediante filtración, se lavó con agua y se secó mediante vacío para dar 4-bencilidenohomoftalimida (18,5 g, 82%) en forma de sólido; p.f. 173-177°C; Se utilizó en forma de crudo en la siguiente etapa.

40 Etapa 3

45 Se añadió borohidruro de sodio (1,2 g, 32 mmol) en pequeñas cantidades a una suspensión de 4-bencilidenohomoftalimida (2 g, 8 mmol) en metanol (50 ml), a continuación la mezcla agitada se calentó a reflujo durante 4 horas, se enfrió hasta temperatura ambiente y se vertió en agua (200 ml). El producto se extrajo en acetato de etilo (3 x 50 ml), los extractos combinados se lavaron con agua (2 x 30 ml), se secaron ($MgSO_4$) y se eliminó el disolvente mediante vacío. El residuo se disolvió en el mínimo volumen de éter y se añadió hexano suficiente para precipitar el producto. El sólido resultante se recogió mediante filtración, se lavó con hexano (20 ml) y se secó mediante vacío para dar el intermedio 4-bencilo-3-hidroxi-3,4-dihidro-1-isoquinolinona que se utiliza sin purificar.

50 Una suspensión agitada del intermedio de arriba (0,1 g, 0,4 mmol), ácido toluen-4-sulfónico (10 mg) y tolueno (50 ml) se calentó a reflujo durante 4 horas mientras se eliminaba el agua de la reacción mediante destilación azeotrópica. La mezcla se dejó enfriar hasta temperatura ambiente, a continuación se lavó con solución acuosa saturada en hidrogenocarbonato de sodio (2 x 30 ml) y agua (2 x 30 ml), se secó ($MgSO_4$), y se eliminó el disolvente mediante vacío para dar 4-bencilo-1-isoquinolinona (0,02 g, 3% después de dos etapas) en forma de sólido. p.f. 217-220°C; δ_H 4,0 (2H, s), 7,0 (1H, s), 7,15-7,3 (5H, m), 7,45 (1H, m), 7,65 (2H, m), 8,25 (1H, d), 11,20 (1H, br S).

55 Los compuestos 9-11 y 15 se prepararon de manera similar a la descrita arriba para el Compuesto 8 excepto en que para los compuestos 10-17 se necesitó la purificación vía cromatografía líquida de alto rendimiento a escala preparativa para aislar el material puro.

60 *Compuesto 9 ($R_{C_1} = 4$ -fluorobencilo, $R_{C_2} = H$).*

Etapa 1

65 Como para el Compuesto 8.

ES 2 282 410 T3

Etapa 2

4-(4-Fluorobencilideno)homoftalimida. Rendimiento, 100%; p.f. 187-191°C; δ_H 7,1-8,2 (9H, m), 11,3-11,7 (1H, br d).

5

Etapa 3

4-(4-Fluorobencilo)-1-isoquinolinona. Rendimiento, 8% después de dos etapas; p.f. 185-188°C; δ_H 4,0 (2H, s), 6,9-7,7 (8H, m), 8,25 (1H, d), 11,20 (1H, br s.); m/z (M+H)⁺ 254.

10

Compuesto 10 ($R_{C1} = 3$, 4-difluorobencilo, $R_{C2} = H$).

Etapa 1

15 Como para el Compuesto 8.

Etapa 2

20 4-(3,4-Difluorobencilideno)homoftalimida. Rendimiento, 76%; p.f. 199-205°C; δ_H 7,1-8,2 (8H, m), 11,3-11,7 (1H, br d).

Etapa 3

25 4-(3,4-difluorobencilo)-1-isoquinolinona. Rendimiento del crudo, 16% después de dos etapas; p.f. 148-150°C; m/z (M+H)⁺ 272 (31% pureza). Purificado mediante cromatografía líquida de alto rendimiento a escala preparativa en una unidad LC Gilson en las siguientes condiciones: Columna - Columna Jones Chromatography Genesis 4 μ C18, 10 mm x 250 mm; Fase móvil A -TFA acuoso 0,1%; Fase móvil B - acetonitrilo; Caudal 6 ml/min; Gradiente - se inicia a 90% A/10% B durante un minuto, aumentando hasta 97% B después de 15 minutos, manteniéndose a esa proporción durante 2 minutos, entonces se vuelve a las condiciones iniciales. La adquisición de picos se basó en la detección de UV a 254 nm y se identificaron los compuestos mediante espectroscopía de masas en un LCQ Finnegan en modo de ión positivo. Tiempo de retención - 4,04 minutos; m/z (M+H)⁺ 272.

Compuesto 11 ($R_{C1} = 3$ -fluorobencilo, $R_{C2} = H$)

35 Etapa 1

Como para el Compuesto 8.

Etapa 2

40 4-(3-fluorobencilideno)homoftalimida. Rendimiento, 79%; p.f. 174-176°C; δ_H 7,1-7,6 (7H, m), 7,95-8,2 (2H, m), 11,3-11,7 (1H, br d).

Etapa 3

45 4-(3-fluorobencilo)-1-isoquinolinona. Rendimiento del crudo, 14% después de dos etapas; p.f. 132-134°C; m/z (M+H)⁺ 254 (37% pureza). Purificado mediante cromatografía líquida de alto rendimiento a escala preparativa en una unidad LC Gilson en las siguientes condiciones: Columna - Columna Jones Chromatography Genesis 4 μ C18, 10 mm x 250 mm; Fase móvil A -TFA acuoso 0,1%; Fase móvil B - acetonitrilo; Caudal 6 ml/min; Gradiente - se inicia a 90% A/10% B durante un minuto, aumentando hasta 97% B después de 15 minutos, manteniéndose a esa proporción durante 2 minutos, entonces se vuelve a las condiciones iniciales. La adquisición de picos se basó en la detección de UV a 254 nm y se identificaron los compuestos mediante espectroscopía de masas en un LCQ Finnegan en modo de ión positivo. Tiempo de retención - 3,91 minutos; m/z (M+H)⁺ 254.

55 Compuesto 15 ($R_{C1} = 4$ -fluoro-3-metoxibencilo, $R_{C2} = H$)

Etapa 1

Como para el Compuesto 8.

60

Etapa 2

65 4-(4-Fluoro-3-metoxibencilo)homoftalimida. Rendimiento, 80%; δ_H 3,7 (3H, s), 7,0-8,1 (8H, m), 11,4-11,7 (1H, br d).

65

ES 2 282 410 T3

Etapa 3

4-(4-fluoro-3-metoxibencilo)-1-isoquinolinona. Rendimiento del crudo, 18% después de dos etapas; sólido pegajo-so; m/z (M+H)⁺ 284 (22% pureza). Purificado mediante cromatografía líquida de alto rendimiento a escala preparativa

- 5 en una unidad LC Gilson en las siguientes condiciones: Columna - Column Jones Chromatography Genesis 4 μ C18, 10 mm x 250 mm; Fase móvil A -TFA acuoso 0,1%; Fase móvil B - acetonitrilo; Caudal 6 ml/min; Gradiente - se inicia a 90% A/10% B durante un minuto, aumentando hasta 97% B después de 15 minutos, manteniéndose a esa proporción durante 2 minutos, entonces se vuelve a las condiciones iniciales. La adquisición de picos se basó en la detección de UV a 254 nm y se identificaron los compuestos mediante espectroscopia de masas en un LCQ Finnegan 10 en modo de ión positivo. Tiempo de retención - 3,84 minutos; m/z (M+H)⁺ 284.

Ensayos biológicos

15 Para asegurar la acción de inhibición de los compuestos, se utilizó el siguiente ensayo para determinar los valores de IC₅₀.

Se incubó el PARP de mamífero, aislado a partir de extracto celular nuclear de Hela, con tampón Z (25 mM de HEPES (Sigma); 12,5 mM en MgCl₂ (Sigma); 50 mM en KCl (Sigma); 1 mM en DDT (Sigma); 10% en glicerol (Sigma) 0,001% en NP-40 (Sigma); pH 7,4) en Flash Plates (Marca Comercial) (NEN, UK) de 96 pocillos y vertiendo 20 las concentraciones de dichos inhibidores añadidos. Todos los compuestos se diluyeron en DMSO y dieron concentraciones de ensayo finales entre 10 y 0,01 μ M, con el DMSO llegaron a concentraciones finales del 1% por pocillo. El volumen de ensayo total por pocillo fue 40 μ l.

25 Después de 10 minutos de incubación a 30°C, las reacciones se iniciaron mediante la adición de 10 μ l de mezcla de reacción, que contenía NAD (5 μ M), ³H-NAD y oligos-ADN 30mer de doble cadena. Los pocillos de reacción designados como positivos y negativos se realizaron en combinación con los pocillos de compuesto (desconocidos) con el objetivo de calcular el % de las actividades enzimáticas. A continuación las placas se agitaron durante 2 minutos y se incubaron a 30°C durante 45 minutos.

30 Seguido a la incubación, las reacciones se pararon mediante la adición de 50 μ l de ácido acético al 30% en cada pocillo. A continuación se agitaron las placas durante 1 hora a temperatura de ambiente.

35 Las placas se transfirieron a un TopCount NXT (MARCA COMERCIAL) (Packard, UK) para contado mediante escintilador. Los valores grabados son contados por minuto (cpm) seguido de un contado de 30 segundos de cada pocillo.

A continuación se calcula el % de actividad enzimática para cada compuesto utilizando la siguiente ecuación:

$$40 \% \text{ Inhibición} = 100 - \left(100 \times \frac{(cpm \text{ de desconocidos} - cpm \text{ negativo medio})}{(cpm \text{ positivo medio} - cpm \text{ negativo medio})} \right)$$

Los resultados se detallan a continuación como valores de IC₅₀ (la concentración a la que se inhibe el 50% de la actividad enzimática), los cuales se determinan en base a una variedad de diferentes concentraciones, generalmente de 45 10 μ M a 0,01 μ M. Dichos valores de IC₅₀ se utilizan para identificar las potencias incrementadas del compuesto.

50 El Factor de Potenciación de Dosis (DEF) es una relación de la mejora de la inhibición del crecimiento celular elucidada a través del compuesto de prueba en presencia de bleomicina comparado con bleomicina sola. Los compuestos de prueba se utilizaron a una concentración fija de 25 μ M. La bleomicina se utilizó a una concentración de 0,5 μ g/ml. La DEF se calculó a partir de la fórmula:

$$\frac{\text{Crecimiento}_{TC}}{\text{Crecimiento}_{control}} \times \frac{\text{Crecimiento}_{bleo}}{\text{Crecimiento}_{(bleo+TC)}}$$

55 Donde Crecimiento_{TC} es el crecimiento celular en presencia del compuesto de prueba; el Crecimiento_{control} el crecimiento celular de las células control; el Crecimiento_{bleo} es el crecimiento celular en presencia de bleomicina; y el Crecimiento_(bleo+TC) es el crecimiento celular en presencia de bleomicina y el compuesto de prueba.

60 El crecimiento celular se evaluó mediante el ensayo de la sulforodamina B (SRB) (Skehan, P., et al., 1990, J. Natl. Cancer Inst., 82, 1107-1112). Se sembraron 2000 células HeLa en cada pocillo de una placa de microtitulación de fondo plano con 96 pocillos en un volumen de 100 μ l y se incubaron durante 6 horas a 37°C. Las células se recolocaron con medio solo o con medio contenido el compuesto de prueba a una concentración final de 25 μ M. Se permitió crecer a las células durante 1 hora más antes de añadir bleomicina tanto a las células tratadas como a las tratadas con el compuesto de prueba. Se utilizaron como control las células que no se trataron ni con bleomicina ni con compuesto de prueba. Las células tratadas sólo con compuesto de prueba se utilizaron para confirmar la inhibición del crecimiento del compuesto de prueba.

ES 2 282 410 T3

Las células se dejaron durante 16 horas más antes de cambiar el medio y permitir que las células crecieran durante 72 horas más a 37°C. A continuación se eliminó el medio y las células se fijaron con 100 μ l de ácido tricloroacético al 10% (p/v). Las placas se incubaron a 4°C durante 20 minutos y a continuación se lavaron cuatro veces con agua. A continuación, cada pocillo de células se tiñó con 100 μ l de SRB al 0,4% (p/v) en ácido acético al 1% durante 20 5 minutos antes de lavarlos cuatro veces con ácido acético al 1%. A continuación se secaron las placas durante 2 horas a temperatura ambiente. El tinte de las células teñidas se solubilizó mediante la adición de 100 μ l de Tris Base 10 mM en cada placa. Las placas se agitaron suavemente y se dejaron a temperatura ambiente durante 30 minutos antes de medir la densidad óptica a 564 nm en un lector de placas de microtitulación Microquant.

10 *Resultados*

IC₅₀ (μ M):

Compuestos 9-11 y 15 \leq 2.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

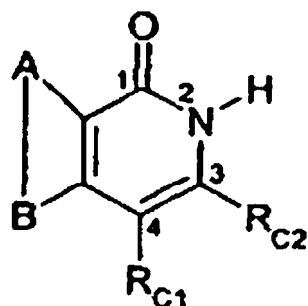
REIVINDICACIONES

1. Compuesto de fórmula:

5

10

15



20 y sus tautómeros, sales y solvatos, donde: A y B juntos representan un anillo bencénico fusionado opcionalmente sustituido; uno de R_{c1} y R_{c2} es $-CH_2-R_L$, y el otro de R_{c1} y R_{c2} es H; y R_L es fluorofenilo.

25 2. Compuesto según la reivindicación 1, donde el anillo bencénico fusionado no está sustituido.

3. Uso de un compuesto según las reivindicaciones 1 ó 2 y sus tautómeros, sales y solvatos, en la preparación de un medicamento para el tratamiento de enfermedades que mejoran con la inhibición de la PARP.

4. Uso de un compuesto según las reivindicaciones 1 ó 2 y sus tautómeros, sales y solvatos, en la preparación de un medicamento para el uso como adyuvante en la terapia del cáncer.

30 5. Uso según la reivindicación 4, donde el adyuvante es para el uso en combinación con radiación ionizante.

6. Uso según la reivindicación 4, donde el adyuvante es para el uso en combinación con agentes quimioterapéuticos.

35 7. Composición farmacéutica que comprende un compuesto según la reivindicación 1 o la reivindicación 2 y sus tautómeros, sales y solvatos y un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable.

40

45

50

55

60

65